



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES
IZTACALA

“EFECTO DE LA SUPLEMENTACION CON ACIDO
FOLICO EN LA TERATOGENESIS INDUCIDA CON
FENITOINA EN RATA”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

B I O L O G O

P R E S E N T A ;

SILVIA LETICIA VERDIN TERAN



LOS REYES IZTACALA. MEX.

1989



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Este trabajo fué realizado bajo la asesoría de la M. en C. Beatriz Vazquez Cruz en el Laboratorio 7 de Farmacología de la Unidad de Morfología y Función de la Escuela Nacional de Estudios Profesionales Iztacala.

DEDICATORIAS

A Joar y Chayo ,la razón de mi existir ...

A Eliasith, por su amor, mi amor, su apoyo y por ser él.

A mis padres: José Rosario y María E., por su excelencia.

A Noya, Carlos, Rita y Rafa por el tesoro de una invaluable verdadera hermandad.

A Miguel Angel por mi admiración por él siempre justificada.

A mis demás familiares por todo y por nada.

Al ruquero de amiga(o)s que tengo por ser una de mis mayores y mejores inversiones en la vida.

GRACIAS A LA VIDA, QUE ME HA DADO TANTO...

AGRADECIMIENTOS

Al M. en C. José Luis Andrade Torres por la asesoría en el análisis estadístico de este trabajo y por su desinteresada e interesante amistad.

Al M. en C. Luis Arturo Baiza Gutman por todo su apoyo brindado, sus horas de paciencia hacia mi persona y su amistad única.

A la Dra. Elsa Calleja por todas las facilidades que me prestó para la realización de este trabajo, por su confianza, su apoyo, y su amistad.

Al M. en C. Sergio Vaca Pacheco por su asesoría en el uso de la computadora, la elaboración de las gráficas y su impulso perenne.

A la M. en C. Beatriz Vazquez Cruz por su dirección en este trabajo de tesis, sus horas dedicadas a él, su impulso y estímulo y por su distinguida amistad.

RESUMEN

Se ha descrito un síndrome de efectos teratogénicos en humano y se han desarrollado diversos modelos experimentales para estudiar la teratogenicidad de la fenitoína. Sin embargo, el mecanismo de acción se desconoce y es muy discutido.

En este trabajo se diseñó un modelo experimental para estudiar la acción teratogena de la fenitoína en rata wistar y se asoció su poder teratogénico con la deficiencia de ácido fólico provocada por su administración. Se sabe que la deficiencia de ácido fólico en la madre produce severas malformaciones en el bebé.

Se utilizaron ratas wistar hembras vírgenes de 200 a 250 g de peso, a las que se les administró fenitoína intraperitonealmente durante los días 7 al 15 de preñez y se determinó la dosis efectiva para producir teratogénesis. Se suplementó con diferentes dosis de ácido fólico por vía oral los mismos días en que se administró la fenitoína para observar el efecto de dicha suplementación sobre los efectos teratogénicos de la fenitoína.

Los resultados encontrados indican que hay teratogénesis inducida con fenitoína en rata wistar, y una disminución de los efectos teratogénicos al suplementarse con ácido fólico. Con la administración de ácido fólico sin otra droga hubo ganancia de peso y tamaño en los fetos.

EFFECTO DE LA SUPLEMENTACION CON ACIDO FOLICO EN LA TERATOGENESIS INDUCIDA CON FENITOINA EN RATA.

INTRODUCCION.

La teratología es el estudio de las causas, mecanismos y manifestaciones de las alteraciones del desarrollo que ocurren antes del nacimiento y que pueden manifestarse al momento del mismo o posteriormente. El resultado de la agresión teratogénica es determinado por el sitio y estado y el estado de desarrollo del órgano afectado. Esto se puede aplicar a todos los defectos congénitos, ya sea debido a alteraciones genéticas o por agentes exógenos. En los defectos genéticos, el esquema indica que el sitio y estado del desarrollo alterado corresponde con el momento en que se expresa el gene mutado; en los defectos no genéticos el sitio y estado en el que ocurre la alteración se relaciona con el momento de la exposición a un agente teratogéno exógeno. Se ha demostrado que muchos agentes químicos como pueden ser algunos fármacos pueden interferir con el desarrollo normal del feto, cuando son introducidos durante el embarazo en animales de laboratorio. Otros agentes que pueden favorecer en el desarrollo de malformaciones congénitas pueden ser deficiencias alimenticias, infecciones virales, hipertermia, desbalances hormonales y varias condiciones de stress. Algunas de las alteraciones que ocurren en el feto pueden ser debidas a defectos hereditarios y pueden ser considerados como de origen mutagénico. A pesar de que, de muchos agentes químicos se conoce su capacidad de producir efectos teratogénos en los animales de laboratorio, no todos tienen la capacidad de producir tales efectos en el hombre, o no se ha comprobado. (Loomis, 1974).

Se ha demostrado que algunos agentes son predominantemente letales, en tanto que otros son extraordinariamente capaces de inducir malformaciones en el feto. Un ejemplo de los primeros sería el 5 - bromo - Uracilo y de los segundos la talidomida.

A principios de la década de los sesentas la teratogenicidad inducida con sustancias químicas fué únicamente de interés para los embriólogos que usaron dichas sustancias como instrumentos para inducir anomalías en investigaciones embriológicas. El subsiguiente interés por los toxicólogos en determinar los efectos embriotóxicos de los agentes químicos fué debido al resultado de la tragedia con la talidomida. En 1962 fué publicada una revisión

retrospectiva de las anomalías fetales que ocurrieron y su frecuencia por el uso de drogas sedantes como la talidomida por la madre durante el embarazo. (Loomis, 1974).

Hasta mediados de los setentas la mayor parte de los estudios teratogénicos han sido relacionados a la talidomida como una simple entidad química. Tales estudios han sido realizados en ocho especies diferentes de animales y diversas cepas de ratas y ratones. La talidomida produce malformaciones en la mayoría de las especies estudiadas, en el caso de otros agentes químicos esto no es siempre así. En general, en las pruebas de una especie los resultados son limitados pues no se puede predecir sus efectos en otras. Este es el caso de la cortisona que es teratogénica para ratón y sólo para algunas cepas de ratas. Los agentes que son fuertemente teratogénicos como la talidomida y altas dosis de vitamina A, producen tipos similares de malformaciones en varias especies. (Saxén, 1976). Cuando las especies tienen una gran diferencia en la respuesta teratogénica al agente químico, sugiere que hay diferencias en la biotransformación del compuesto en dichas especies, y puede involucrar un metabolito del compuesto base. Esto indica que la susceptibilidad a la teratogénesis depende del genotipo y de la manera en el cual interactúa con el medio ambiente, y en otros casos son mezclas variadas de influencias genéticas y medioambientales. (Vornhes 1986, Saxén 1976).

La vulnerabilidad durante el desarrollo embrionario de los organismos es mayor que en los adultos, y generalmente entre más rápido sea el desarrollo, el organismo es más vulnerable a las influencias desorganizadoras. La susceptibilidad al daño prenatal varía según los distintos periodos del desarrollo (preimplantación, organogénesis, histogénesis y organización funcional). Es ampliamente conocido que las malformaciones son mayores cuando el agente actúa durante la formación de las capas germinales primarias y en la organogénesis, constituyéndose este, como el periodo donde los organismos son más vulnerables a un daño capaz de producir malformaciones. En la mayoría de los casos, este es el único periodo en el cual la exposición a los agentes químicos pueden producir malformaciones. Antes de este periodo, la respuesta a influencias tóxicas es generalmente del tipo de todo o nada; cuando el daño es insuficiente para matar al embrión, este sobrevive y se implanta sin aparentes secuelas, o sucumbe a la influencia tóxica y muere. En este caso la malformación no ocurre. (Spielmann, 1982).

La histogénesis coincide con la organogénesis, la cual precede a la organización funcional. Los daños a los organismos en desarrollo durante la histogénesis son

detectables como anomalías celulares microscópicas, cambios en el crecimiento o daños funcionales pero no como malformaciones.

La última fase de eventos en el desarrollo es de organización e involucra la adquisición funcional de cada sistema y probablemente representa los cambios estructurales finos o ultrafinos, muchos de los cuales ocurren en la superficie celular e involucran el establecimiento de sitios receptores y sistemas secretores y el disparo de vías bioquímicas necesarias para la realización de funciones especializadas. La organización funcional ocurre durante la fetogénesis y se extiende hasta la vida postnatal. El nacimiento es el acontecimiento más importante en el desarrollo, marca uno de los cambios en la capacidad del organismo para existir en un ambiente menos protegido, y también, representa un cambio en los factores que influyen en el desarrollo. Sin embargo, desde el punto de vista del desarrollo celular, el nacimiento no representa un cambio importante en el desenvolvimiento de estos procesos. La histogénesis continúa, la organización funcional y el crecimiento ocurren en muchos sistemas orgánicos hasta después del nacimiento, - el ejemplo más notable es el cerebro (en humano hasta los dos primeros años de vida). (Vörhees, 1986a,1986).

Los agentes teratógenos pueden ser físicos (radiaciones), biológicos (virus) y químicos (drogas) y actúan sobre vías o mecanismos específicos en el desarrollo de células y tejidos provocando una embriogénesis anormal (patogénesis). La acción tóxica puede presentarse en varios niveles. En general, las manifestaciones del desarrollo anormal son la muerte, malformaciones, retardo en el crecimiento y desorden funcional. En lo que se conoce como respuesta teratógena, las malformaciones han sido y continúan siendo, el punto principal del campo de la teratología. El retardo en el crecimiento es como secundario, ya que su efecto es menos severo que las malformaciones. La dificultad para estudiar los efectos en el crecimiento, es que éstos nunca han sido claros, aún así, el retardo en el crecimiento es considerada como la primera señal de efectos teratógenos menos severos que las malformaciones y representa un mayor probabilidad de supervivencia y salud. Estadísticamente se ha asociado con el daño funcional pero el daño moderado en el crecimiento nunca ha sido documentado claramente como patológico por sí mismo. En muchos ejemplos, el daño en el crecimiento probablemente representa el único signo más visible de un cambio fundamentalmente patológico. (Vörhees 1986,1987). El desorden funcional incluye disfunciones importantes de algunos órganos o sistemas biológicos, que pueden ser cardiovasculares, respiratorios, hepáticos, renales, musculoesqueléticos, genitourinario-

reproductivos, hormonales, metabólicos, inmunológicos o neuroconductuales, y puede incluir carcinogénesis transplacental (que resulta de la administración de dietilestilbestrol en época tardía del embarazo). (Textbook Adverse Drugs, 1982).

El acceso de agentes adversos del medio ambiente a un tejido en desarrollo depende de la naturaleza de estos, por ejemplo las radiaciones ionizantes atraviesan el cuerpo de la madre sin que tengan que pasar a través de la circulación sanguínea como lo hacen las drogas. Los agentes biológicos pueden pasar el cuerpo materno y cruzar la barrera placentaria, los agentes biológicos que tienen mas capacidad de daño teratógeno son: el citomegalus, el virus de la rubeola, herpes simple, *Treponema pallidum*, *Toxoplasma gondii*, y *Mycobacterium tuberculosis*. (Loomis, 1974).

En el caso de las drogas, que están circulando en la sangre materna, pueden pasar a la sangre fetal, por las mismas vías que suministran al feto las sustancias necesarias para su desarrollo y crecimiento y que también eliminan los materiales de desecho. Este intercambio se realiza en la placenta que conecta al embrión o feto con la pared uterina de la madre. En el humano, el interior de la placenta contiene lagunas relativamente grandes a las que llega la sangre arterial materna y de los que emergen venas que canalizan la circulación de retorno de la madre. Unas estructuras digitaliformes (vellosidades), que hacen prominencia en el interior de los senos sanguíneos, contienen capilares del feto. Por tanto las sangres fetal y materna no se mezclan y la transferencia de solutos se lleva a cabo a través de las células epiteliales de las vellosidades y el endotelio de los capilares fetales. Las sustancias que penetran en los capilares del feto llegan a éste por la sangre venosa umbilical y las sustancias que pasan del feto a la madre van hacia las vellosidades por la sangre arterial umbilical. El paso o difusión de las drogas desde la sangre materna a la fetal es a través de la placenta y es parecido al paso a través de cualquier barrera epitelial, dependiendo de su liposolubilidad, grado de ionización y tamaño de la molecula. La velocidad y la dirección del intercambio dependen de los gradientes de concentración y de los flujos sanguíneos en las vellosidades y entre los espacios que quedan entre ellos. (Katzung, 1981).

La distribución de las drogas de la madre al feto se inicia con la difusión del fármaco a través de la membrana de la vellosidad y su penetración en el capilar sanguíneo fetal, la droga es llevada al feto por vía umbilical quedando en disposición para distribuirse a los diversos órganos y tejidos fetales. La sangre venosa del cordón umbilical se equilibra con la sangre materna más rapido que con los diversos tejidos del

feto, se ha calculado que el tiempo mínimo para llegar a este equilibrio es de 40 minutos. La cantidad de flujo sanguíneo materno a través de la placenta limita la cantidad de fármaco al feto. Y todos los principios farmacológicos que incluyen absorción, biotransformación, distribución tisular, unión proteica y eliminación son aplicables tanto al organismo materno como al organismo fetal, excepto que en el último, la farmacodinamia es marcadamente diferente por la inmadurez de funciones tales como los sistemas enzimáticos microsomiales del hígado y la barrera hemato-encefálica. (Saxén, 1976).

Existe una línea enorme de fármacos teratogénos, entre los más estudiados están la talidomida, la aminopterina y la quinina y de los que recientemente se consideran teratogénos tenemos a los anticonvulsivantes, que se utilizan en mujeres epilépticas durante todo el embarazo. Entre los fármacos más empleados como anticonvulsivantes está la fenitoina de la cual se hace una breve descripción.

FENITOINA

La fenitoina es una droga de elección primaria para todos los tipos de epilepsia excepto para los casos de ausencia (Pequeño mal), así como para otros padecimientos no relacionados con los estados epilépticos (antiarrítmico, calmante de los dolores del nervio trigémino y miotonía). Por lo que se ha estudiado ampliamente en el laboratorio y en clínica (Perry, 1978 ; Goodman, 1982).

Esta droga fué sintetizada en 1908 por Bitzz y en 1938 Merrit y Putman en su búsqueda por un anticonvulsivante no sedante descubrieron esta cualidad en la fenitoina cuya fórmula estructural se puede observar en la figura 1. (Glazko 1986).

Los efectos farmacológicos sobre el sistema nervioso central en el control de la epilepsia se basan en su capacidad para limitar el desarrollo de la actividad máxima de la crisis convulsiva y para reducir la difusión del proceso, ya que restablece a la normalidad la excitabilidad patológicamente aumentada de las células estimuladas porque inhibe el transporte de sodio, reduce el influjo de calcio y tiene una interferencia específica con los movimientos trasmisores de sinapsis. Esto es, también interfiere con el transporte activo de sodio/potasio. Si se cree que los eventos sinápticos mediados por el calcio están implicados en la patogenésis de la epilepsia es entendible su modo de acción, ya que al reducir el flujo de calcio puede reducirse la acción convulsivante, pues disminuye la polarización estimulada por la salida de calcio. Por este mecanismo inhibe una gran variedad de procesos de-

pendientes del calcio, incluyendo el metabolismo de nucleótidos cíclicos, la fosforilación proteica y la liberación de hormonas y neurotransmisores. Todos estos procesos son afectados porque la fenitoína inhibe los canales de calcio dependientes de voltaje. (Greenberg 1984, Morello 1984, Seizer 1985, White 1985).

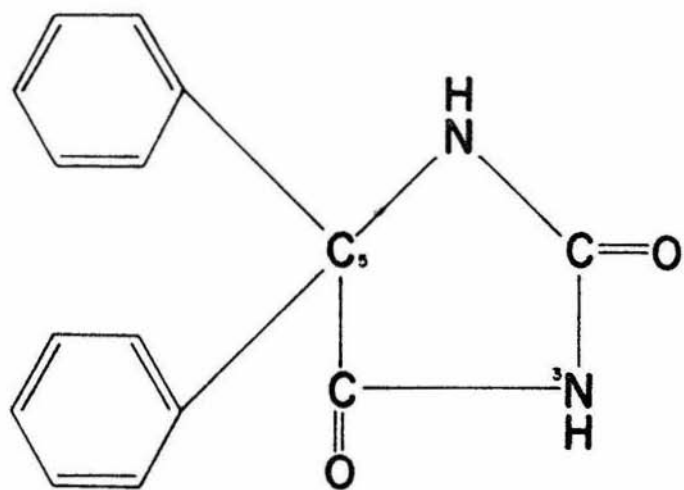
Las características farmacocinéticas de la fenitoína están basadas principalmente en su poca hidrosolubilidad, es altamente soluble en álcalis a 26°C pero es prácticamente insoluble en agua, es parcialmente soluble en alcohol y muy soluble en éter y cloroformo, su absorción cuando se administra por vía oral es lenta y a veces incompleta, produciéndose niveles máximos en el plasma alrededor de 6 a 8 horas después de su administración en rata y en humano, por administración intramuscular se precipita en el sitio de aplicación y se absorbe lentamente (Swartz 1977).

La fenitoína se liga en gran parte (alrededor del 90%) a las proteínas plásmáticas, principalmente a la albumina. Se distribuye ampliamente en todos los tejidos. La unión fraccionada en los tejidos, incluso en el encéfalo, es aproximadamente la misma que en el plasma, alrededor de 14 ug/ml, la concentración en el líquido cefalorraquídeo es igual a la fracción plasmática libre indicando un paso fácil de la fenitoína a través de la barrera hemato-encéfalica.

Aproximadamente el 2% de esta droga se excreta sin cambios por la orina. El resto se metaboliza principalmente por enzimas hepáticas microsomales, es hidroxilada a 5-phenyl-5-parahidroxi-fenilhidantoina, conjugada con ácido glucurónico y excretada inicialmente por la bilis y luego por la orina. Otros metabolitos aparentemente inactivos son el dihidroxi-catecol y su derivado 3-metoxi, y el dihidrodíol. (Goodman 1982, Katzung 1981).

Los efectos tóxicos dependen de la vía de administración que se use, la dosis y la duración de la exposición. Cuando se administra rápidamente por vía intravenosa puede provocar colapso cardiovascular y depresión del sistema nervioso central además de flebitis y dolor. La sobredosis oral afecta al sistema vestibular, produce cambios en la conducta, sistemas gastrointestinales, hiperplasia gingival, osteomalacia, cáncer y anemia megaloblástica asociada a la deficiencia de ácido fólico provocada por éste fármaco. (Goodman 1982, Keith 1976, Seth 1987).

Los efectos teratogénos fueron descubiertos incluso antes de su uso clínico y se ha acumulado una serie de pruebas epidemiológicas en humano y de laboratorio en otras especies que comprueban tales efectos. Hanson (1977) describe un conjunto o patrón de defectos que llama "Síndrome fetal de la hidantoina" cuyas alteraciones incluyen 2 tipos: craneofaciales y



Fenitoína

Figura 1.- Estructura Química de la Fenitoína (Difenil, hidantoína)

somáticas. Vorhees (1986) describió el patrón de malformaciones neuroconductuales.

- Las malformaciones craneofaciales incluyen:
- Orejas más bajas de lo normal y malformadas
 - Tabique de la nariz muy largo
 - Nariz muy corta
 - Pliegos epicánticos
 - Hipertelorismo
 - Anormalidades oculares como ptosis y estrabismo
 - Boca muy ancha y labios prominentes
 - Cabeza de tamaño anormal (más grande) y con fontanela muy ancha.

Las malformaciones somáticas son:

a) Malformaciones en las extremidades:

- Hipoplasia de la falanges distales
- Hipoplasia de las uñas
- Dedos en forma de pulgar
- Arrugas palmares atípicas
- Colchón de los dedos bajo

b) Malformaciones de otro tipo:

- Espina bifida
- Pezones espaciados e hipoplásicos
- Hernias inguinales e umbilicales
- Anormalidades genitales

c) Malformaciones mayores y menos frecuentes

- Labio leporino
- Paladar hendido
- Anormalidades cardiovasculares
- Defectos renales
- Deformidades en la posición de los miembros
- Hernias diafragmáticas

(Hanson 1975, 1976, Kraus 1984).

Se reporta también retardo en el crecimiento, pues hay una talla y peso de los recién nacidos un 25% menos de lo normal.

d) Malformaciones neuroconductuales:

- Retardo mental
- Fallas en el proceso de aprendizaje
- Fallas en la memoria o memoria muy pobre.
- Deficiencias psicomotoras: dificultad para caminar, nadar, brincar, correr, etc. (Vorhees 1986, 1987, Lorente 1981).

El mecanismo teratógeno de la fenitoína se desconoce, aunque se asocia a la deficiencia de ácido fólico la cual es común en una gran mayoría de los pacientes que toman este anticonvulsivante. Se ha encontrado, que las anomalías presentadas en el síndrome fetal de la hidantoína son muy similares a las producidas por la administración de antagonistas del ácido fólico durante la preñez. (Netzlöff 1977, Lakos 1982, Gram 1984, Hansen 1985, Trimble 1980).

ACIDO FOLICO

Es el nombre común para el ácido pteroilglutámico, compuesto madre de un grupo de factores de crecimiento y coenzimas que colectivamente son llamados folatos. El ácido fólico se conforma de tres estructuras (Fig. 2) : a) un derivado de piridina, b) ácido paraaminobenzoico, c) ácido glutámico.

Se encuentran en la naturaleza en varias formas conjugadas al unirse diversas fracciones de ácido glutámico a la porción pteroil de la molécula produciéndose monoglutamatos, triglutamatos o poliglutamatos. La solubilidad decrece conforme el número de residuos glutamilo aumenta, y hay evidencias de que en la absorción intestinal los conjugados más grandes requieren de hidrólisis parcial de la cadena de poliglutamatos por enzimas llamadas conjugasas. El ácido fólico sintético usado clínicamente es el pteroilglutamato el cual después de la absorción se reduce rápidamente en las posiciones 5,6,7, y 8. El ácido tetrahidrofólico (FH4) que actúa como aceptor de unidades monocarbónicas, unidas en la posición 10 o cruzan un puente entre estos átomos para formar un anillo de 5 miembros. Las diversas formas del folato son interconvertibles por varias reacciones enzimáticas y tienen la importante función bioquímica de donar unidades de un sólo carbón en varios niveles de oxidación. En la mayor parte de los casos el tetrahidrofolato es regenerado en estas reacciones y se encuentra disponible para usarse nuevamente. Las formas más importantes de la coenzima tienen un papel específico en el metabolismo intracelular. (Esquema 1)

Algunas de las funciones del ácido fólico se resumen a continuación:

- 1) Conversión de homocisteína en metionina. Esta reacción requiere de metiltetrahydropteroyl-glutamato como donador de un grupo metilo y utiliza vitamina B-12 como cofactor.
- 2) Conversión de serina en glicina. Esta reacción requiere tetrahidrofolato como aceptor de un grupo metileno de la serina y utiliza fosfato de piridoxal (vitamina B-6). De ella se forma 5,10 metenil-tetrahydrofolato, una coenzima esencial para la síntesis de timidilato (dTMP).
- 3) Síntesis de timidilato. El metil-pteroylglutámico dona un grupo metilo al desoxiuridilato para la síntesis del timidilato, un paso limitante en la síntesis de DNA.
- 4) Metabolismo de la histidina. El tetrahidrofolato también actúa como aceptor de un grupo formiminoglutamato del formilformiminoglutamato.
- 5) Síntesis de purinas. Dos pasos en la síntesis de nucleótidos de purina requieren la participación de derivados de ácido fólico. El ribonucleótido de glicinamida es formilado por el 5,10 metil,tetra, pteroyl-glutámico. El ribonucleótido de 5-aminoimidazol-4-carboxiamida es formilado por el 10-formil-tetrahydrofolato.

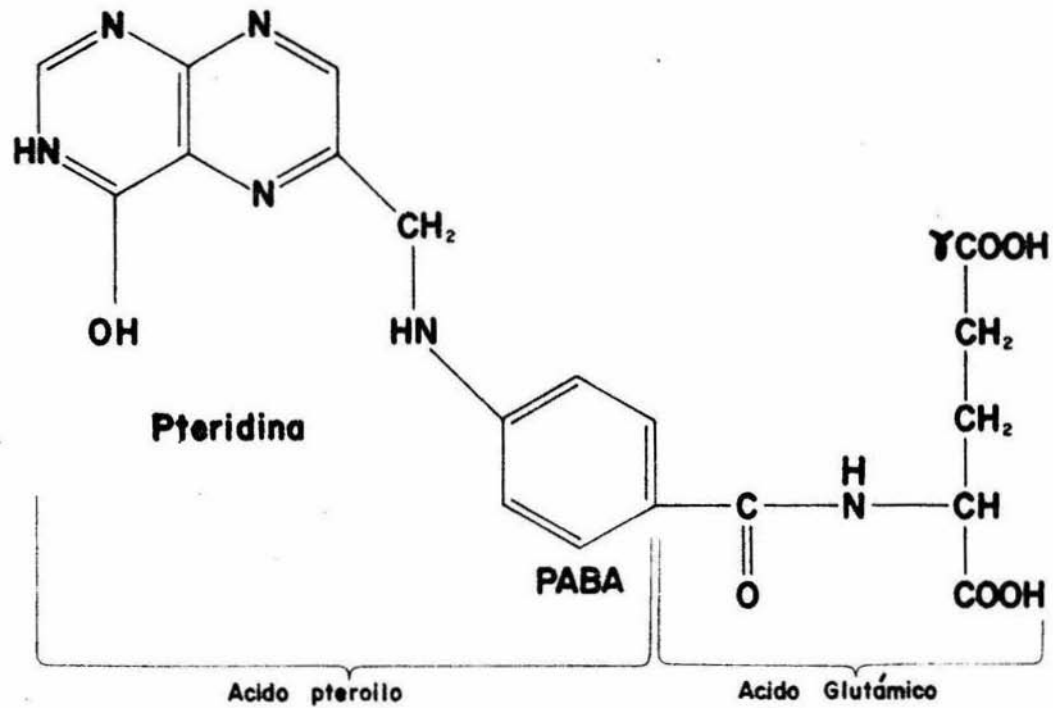


Figura.-2.-Estructura Química del ácido Fólico

La mayoría de los compuestos de los grupos folato están ampliamente distribuidos en la naturaleza. Las hojas verdes son especialmente ricas en esta vitamina y se presume que son los sitios en que se sintetiza.

El ácido fólico en formas libres, conjugadas y sus derivados se encuentran en muchos alimentos; las principales fuentes en la dieta promedio son vegetales frondosos, fruta, leche, productos lácteos e hígado. La cocción prolongada puede destruir el 90% del contenido de folato en los alimentos. Generalmente la dieta estadounidense común suministra de 50 a 500 μg de folato absorbible por día. En el adulto normal el requerimiento mínimo diario se estima en 50 μg y en las mujeres que amamantan o embarazadas y los pacientes con gran recambio celular pueden necesitar hasta los 100 a 200 μg o más por día. Normalmente de 5 a 20 mg de los folatos se almacenan en el hígado o en otros tejidos. (Goodman, 1982).

Los folatos presentes en los alimentos son generalmente poliglutamatos reducidos, y para su absorción se requiere de la presencia del transportador pteroil - γ - glutamil carboxipeptidasa asociada a las membranas de las mucosas.

La mucosa del duodeno y de la parte superior del yeyuno son ricas en dihidrofolato reductasa, capaces de metabolizar todo o casi todo el folato que se absorbe.

En los tejidos donde se utiliza, el ácido fólico es reducido primero a ácido tetrahydrofólico que actúa como portador de radicales de un carbono que al convertirse en ácido 5 - metiltetrahydrofólico es la forma principal en el plasma. Este compuesto y la homocisteína forman tetrahydrofolato y metionina que desempeñan un papel esencial en todas las reacciones de transmetilación.

La provisión de ácido pteroilglutámico se mantiene por medio de los alimentos y algunos folatos son sintetizados por bacterias intestinales y por un ciclo enterohepático de la vitamina. En el hígado se reduce activamente y metila al pteroilglutámico y luego se transporta al metil tetrahydrofolato por la bilis para su reabsorción en el intestino y la subsiguiente distribución a los tejidos. La importancia del ciclo enterohepático se sugiere por estudios con animales que presentan una rápida reducción de la concentración plásmatica del folato del drenaje de la bilis o de la ingestión de alcohol que bloquean la liberación del metilhydrofolato de las células del parénquima hepático. (Goodman 1982, Drill's 1987).

El signo principal de deficiencia de ácido fólico es la anemia megaloblástica grave, la carencia dietética es común en personas de pocos recursos en las zonas tropicales y se produce en ocasiones durante el embarazo sobre todo en los

países del tercer mundo, también en los trastornos de la digestión, el abuso del alcohol, cáncer, uremia y con el uso de antiepilépticos como la fenitoína. (Drill's 1982).

En ausencia de ácido fólico la división normal de las células se interrumpe en metafase y la multiplicación y maduración de las células resultan perturbadas. (Katzung 1981).

Trimble en 1980 cita que en años recientes existe una interesante asociación entre la deficiencia de ácido fólico y síntomas de enfermedades neuropsiquiátricas. Las enfermedades que se relacionan con esta deficiencia son demencia, esquizofrenia y demencia senil. Trimble encontró que existe la coincidencia de esta deficiencia en pacientes psiquiátricos y pacientes epilépticos que toman fenitoína. Esta deficiencia da como resultado alteraciones funcionales de neurotransmisores donde el ácido fólico juega un papel importante en el metabolismo central de monoaminas (las alteraciones en la actividad de las monoaminas producen cambios severos en el estado mental). (Trimble 1980, Reynolds 1969, Maxwell 1972).

La deficiencia de ácido fólico durante el embarazo ha sido asociada con diversos problemas obstétricos, incluyendo *abruptio placentae* (desprendimiento placentario), abortos, bebés muertos al nacer, anomalías congénitas, nacimientos prematuros, y bajo peso neonatal. (Warnock 1979, Locatelli 1986, Morgan 1978).

ESQUEMA 1

SISTEMA	PAPEL DEL ACIDO FOLICO
Serina-Glicina	Serina + FH4 ===== N5,N10 metil FH4 + glicina
Síntesis de Timidilato	Deoxuridato(dUMP)+N5,N10 metilFH4+ ===== FH2 + Timidilato (dTMP)
Catabolismo de Histidina	Formiminoglutamato + FH4 ===== N5-formimino FH4 + glutamato
Síntesis de Metionina	Homocisteína + N5-metil FH4 ===== metionina + FH4
Síntesis de Purina	Glicinamida ribotido + N5,N10 - metenil FH4 ===== FH4 + formilglicinamida ribotido
Síntesis de Purina	5-amino-4 imidazol carboxamida ribotido (AICAR) + N10- formil FH4 ===== 5 - forfamo-4-imidazol carboximida ribotido.

Sistemas metabólicos en los que participa el ácido fólico como coenzima en reacciones donadoras-aceptoras de unidades de un átomo de carbono.

(Copiado de Drill's Pharmacology in Medicine, 1960).

ANTECEDENTES

En años recientes ha sido aparente que muchas drogas administradas durante el embarazo o la lactancia puede afectar adversamente al embrión, al feto, o al infante. Ya que el neonato es menos capaz que el adulto para metabolizar y excretar ciertas drogas y entonces es más susceptible a efectos indeseados.

Debido a que la mayoría de las drogas que están en la circulación materna pasan a la circulación fetal, no es sorprendente que algunas veces causen efectos adversos. Hay pocas drogas estudiadas que se sabe son teratogénicas en el hombre y otras que son causantes de defectos congénitos en únicamente en un 0.5 - 1 % de anomalías. (Textbook of adverse drugs 1982).

Existe una serie de reportes epidemiológicos que demuestran el poder teratogénico de los anticonvulsivantes y en todos se menciona a la fenitoína. Sin embargo, el riesgo teratogénico que se le atribuye al tratamiento con drogas o la epilepsia por sí misma es de controversia. De las drogas anticonvulsivantes, la fenitoína y la tioxidona (trimetadiona) han sido particularmente implicadas y en ambos casos se ha descrito un síndrome fetal encontrado en infantes de madres que tomaron estos agentes en el primer trimestre del embarazo. Estos síndromes consisten en múltiples defectos craneofaciales y cardíacos, malformaciones del sistema nervioso y otros. La incidencia de este síndrome parece ser más grande con trimetadiona que con fenitoína, pero se ha encontrado una mayor relación entre los niveles plásmaticos de la fenitoína y la frecuencia de malformaciones (Mogens y Dam 1982).

La posibilidad de que la epilepsia, más que el tratamiento con drogas, sea la responsable de las malformaciones ha sido considerada. Las investigaciones hechas sugieren que, las epilépticas como un grupo, tienden a reproducirse más jóvenes y con una fertilidad aumentada (mayor número de hijos) que el general de la población. La hyperemesis gravidarum (vomitos excesivos durante el embarazo) se reporta en un porcentaje de 0.63% en epilépticas contra de un 0.68 % en mujeres normales. El riesgo de abortos es casi el mismo tanto en mujeres con epilepsia como en mujeres sin epilepsia. (Lakos 1977, Fredick 1973).

El número de complicaciones reportadas, posiblemente asociadas con la disminución de las contracciones uterinas y consecuentemente las hemorragias, son más altas en mujeres con epilepsia que en las sanas. La toxemia del embarazo se re-

porta igual, sin embargo, la mortalidad perinatal de las pacientes con epilepsia es mayor, casi al doble que las pacientes sanas. Aunque son pocas las investigaciones que han concluido que la epilepsia causa sobre la preñez mayores complicaciones obstetricas, principalmente con altos riesgos durante la labor de parto. (Fredick 1973, Philbert 1982).

Se estima que el porcentaje de malformaciones fetales que se presenta en una población normal es de 2.2 a 2.5 %. Las mujeres epilépticas sin tratamiento presentan este mismo valor, a diferencia de los bebés de madres epilépticas con tratamiento anticonvulsivante durante todo su embarazo que presentan hasta un 7.8% de malformaciones, casi 2.5 veces más de lo normal, o sea que, la incidencia de defectos congénitos es de dos o tres veces más grande que en los niños de madres epilépticas sin tratamiento y madres sanas. (Fredick 1973, Lakos 1977, Philbert 1982, Mongens-Hanson 1976).

El estudio de la teratogenesis con fenitoína ha dado como resultado toda una línea de trabajo para muchos investigadores, desde la descripción morfológica hasta la complicada y discutida teratología conductual. Sin embargo, el mecanismo que tiene la fenitoína para causar malformaciones no se ha aclarado y esta sujeta a ciertas discrepancias entre los mismos investigadores. Hasta el momento la relación entre la deficiencia de ácido fólico que produce la fenitoína y las malformaciones que ésta produce es la más aceptada, pero el mecanismo de estas interacciones que dan como resultado malformaciones no se conoce aún.

Hanson en 1975 describió un síndrome que denominó como síndrome fetal de la hidantoína donde presenta a pacientes que nacieron de madres que tomaron fenitoína durante su embarazo y que todos estos infantes demostraron un patrón particular de malformaciones. Desde entonces existen diversos estudios en animales de laboratorio, que demuestran que existe una relación dosis-respuesta en la frecuencia de malformaciones en los animales expuestos. También existen otros trabajos que sugieren una susceptibilidad mayor en algunas cepas de ratones a la fenitoína que otras. La inducción de paladar hendido por la fenitoína es facilitada por la presencia de ciertos alelos en el complejo H2. En rata se han empleado diversos modelos de estudio para la acción teratogénica de la fenitoína. Harbinson (1972) demostró que la fenitoína induce anomalías con diferente espectro y frecuencia que las inducidas en ratón. Estas diferencias son probablemente el resultado de la variación de las especies en el periodo del desarrollo embriológico así como en la regulación genética y morfogénesis. El efecto de la fenitoína sobre el crecimiento fetal y sobre la mortalidad del embrión fué similar en ambas especies. Pero la susceptibilidad fué mayor en el ratón. (Harbinson 1972, Elmazar 1981, Bruckner 1983).

Existen varias hipótesis sobre el mecanismo de la fenitona para inducir teratogénesis, sin embargo ninguna ha sido comprobada. Harbinson (1972) mencionó en su trabajo que Wirdood y Lennman han demostrado que existe una competencia entre el ácido fólico y la fenitoina por enzimas necesarias para la síntesis de ácidos nucleicos. (lo que no explica la disminución de folatos que se presenta con fenitoina), sin discutir si este es el mecanismo por la cual es teratogéna la fenitoina. Se dice que también bloquea la inducción por cortisol de una enzima colagenolítica. Y que la fibroplasia y proliferación epitelial fueron incrementadas en gingiva por la fenitoina. (Dill 1986). Aunque el autor concluye que estas respuestas son dadas según la carga genética y que pueden ser controladas con un buen cepillado y limpieza bucal profesional. De estos mecanismos se han buscado explicaciones pero no hay ninguno aceptado concluyentemente.

Marsh y Fraser (1973), señalan que la fenitoina produce teratogénesis por ser un agente quelante (como la cortisona y los salicilatos), esto es, que puede captar iones metálicos requeridos por enzimas para la síntesis y maduración de colágena y que su efecto puede anularse si se administran complementos dietéticos de minerales, esto no ha sido comprobado pero en general la mayoría de los autores descartan esta teoría por existir otras con mayores fundamentos.

Otro mecanismo involucra los metabolitos intermediarios de la fenitoina como los causantes de las malformaciones, este mecanismo únicamente se ha comprobado en ratón y el análisis estadístico que se presenta no es significativo, los autores discuten que las diferencias pueden estar dadas por las variaciones genéticas de cada individuo, sin tomar en cuenta que el metabolismo del ratón es diferente al de rata y humano y además como lo cita Maxwell (1981) la carbamezapina y el fenobarbital también producen los mismos metabolitos que la fenitoina y no se presenta el mismo patrón de malformaciones congénitas. (Martz 1977, Maxwell 1981).

Existen evidencias clínicas y de laboratorio que sugieren que la teratogénesis inducida por fenitoina involucra antagonismo por el folato. Ya que existen patrones de anomalías similares o comparables entre mujeres embarazadas con terapia de fenitoina y mujeres que han tenido que estar expuestas a antagonistas de ácido fólico como el 6-metyl-PGA (metrotexate). Por otro lado se han producido malformaciones similares en camadas de animales experimentales tratados con deficiencia de ácido fólico o administración del 6-metyl-Pga. (Nelson 1960, Harbinson y Becker 1969).

La deficiencia de ácido fólico durante la preñez ha sido asociada con diversos problemas obstétricos y anomalías

congénitas incluyendo bajo peso al nacer y deficiencia en el tamaño de los bebés. Warnock en 1979 demostró que la deficiencia dietética de ácido fólico puede hacer caer dramáticamente los niveles de folatos en los tejidos maternos y fetales y afectar significativamente el crecimiento de los tejidos fetales. Cuando se usan sulfonamidas o antagonistas de ácido fólico puede ocurrir depresión en el crecimiento, reabsorción fetal o anomalías congénitas. (Katzung 1974).

La terapia anticonvulsivante con fenitoína produce deficiencias severas de folatos en plasma. (Gram y col. 1982, Reynolds 1967, Maxwell 1972, Trimble 1980).

Netzloff et-al en 1979 postularon que la teratogénesis por fenitoína es mediada por antagonismo del ácido fólico que provoca reducción en la cantidad de oxígeno consumido, (parámetro en el cual estos autores se basaron) sugiriendo que puede afectar la embriogénesis por una deficiencia de ácido fólico, ya que hembras preñadas de ratón tratadas con una dosis única de fenitoína presentaron una disminución notable de ácido fólico y proteína embrionaria total. La deficiencia de folatos interfiere con la síntesis de ácidos nucleicos por la disminución de la transferencia de los grupos metil activados por el folato.

La S-adenosil-metionina (SAM) es otro intermediario que tiene un papel importante en la transferencia de grupos metilo para la síntesis de ácidos nucleicos y es precursor de las poliaminas espermidina y espermina. Se han reportado disminuciones significativas de estas poliaminas en embriones de ratas tratadas con fenitoína pero no con un antagonista de éste. El decremento de los niveles de poliaminas durante el tratamiento con fenitoína puede ser causado por la disminución de los niveles de SAM. Esto último sugiere Netzloff, puede aumentar el efecto de la disminución de los contenidos de folato en embriones.

La dihidrofolato reductasa es importante para mantener los folatos reducidos requeridos para la producción de RNA, DNA y proteínas. La disminución de poliaminas producida por la fenitoína puede prevenir la estimulación normal de la dihidrofolato reductasa lo cual puede producir malformaciones. La fenitoína no inhibe directamente la dihidrofolato reductasa como el 9 - metil - pteroilglutamato (antagonista del ácido fólico). Sin embargo, Netzloff demostró que la fenitoína ocasiona una disminución en las concentraciones de folato y las poliaminas embrionarias. La disminución de poliaminas puede reflejarse en la disminución de SAM o en la desactivación de la dihidrofolato reductasa y es ahí donde se sugiere pueda radicar el potencial teratogéneo de la fenitoína. (Netzloff 1977).

En el trabajo de teratogénesis *in vitro* de Chatot (1984), se demostró que existe una disminución de las malformaciones inducidas en embriones cuando se administra ácido fólico en presencia de cantidades plasmáticas terapéuticas de la fenitoína y que inclusive éste efecto es potenciado en presencia de la cianocobalamina (vitamina B-12). Esto es una evidencia más de que la teratogénesis inducida por la fenitoína probablemente este relacionada con la falta de ácido fólico.

Sin embargo en ninguno de los trabajos anteriores se ha evaluado la suplementación directa del ácido fólico y ver si los efectos teratogénos de la fenitoína disminuyen. Si bien todos ellos relacionan la deficiencia de folatos materna y fetal provocada por la fenitoína con la incidencia de teratogénesis y unicamente tratan de discernir si existen vías metabólicas implicadas con la farmacología de la fenitoína y del folato.

OBJETIVO

Investigar si la suplementación con ácido fólico disminuye o protege de los efectos teratogénos a las camadas de las ratas tratadas simultaneamente con fenitoína.

MATERIAL Y METODOS

Se utilizaron ratas wistar virgenes de 200-250 gr de peso las cuales se aparearon con machos wistar, el día que se encontraron espermatozoides en el frotis vaginal se denominó día 1 de preñez. A todos los animales se les mantuvo con agua y comida *ad libitum* y ciclo de luz-obscuridad de 14-10 hrs con temperatura controlada de 22°C. Se formaron 6 lotes de 8 ratas cada uno y los días 8 al 15 de preñez se les administro diariamente por via intraperitoneal a cada lote lo siguiente: a) fenitoína (difenilhidantoinato sódico, solución inyectable; Epamin, Parke Davis) en dosis de 50, 75, 85, 100 mg/kg. b) Control del vehículo del Epamina (solución salina- propilén glicol-etanol absoluto 50:40:10). c) El sexto lote no recibió tratamiento (control negativo).

Las ratas se pesaron diariamente y se sacrificaron el día 19 de preñez por sobredosis de éter y se les practicó la laparatomía para extraerles los fetos, que fueron pesados en balanza analítica (Sartorius GMBH tipo 2842), medidos con regla milimétrica la distancia cefalo-caudal y fijados en etanol al 80%. A una tercera parte de las camadas se les aplicó la técnica modificada de transparentado y tinción con azul de alcian-rojo de alizarina según Kimmel. Las modificaciones a esta técnica fueron realizadas en el transcurso de este trabajo y fueron las siguientes: 1o. Fijación con etanol al 80% por un máximo de 24 hrs y un mínimo de 12 hrs. 2o. Se eliminó el baño en agua caliente y el despellejamiento 3o. Los fetos se guardaron en glicerina al 100% con cristales de fenol.

Se contaron los sitios de reabsorción y el número de fetos por camada encontrados en el útero.

Una vez seleccionada la dosis de fenitoína que produjo alrededor del 50% de malformaciones, se usaron otros 7 lotes de ratas wistar hembras que se mantuvieron en las mismas condiciones que las anteriores, y recibieron el siguiente tratamiento: a los 3 primeros grupos se les administró fenitoína 85 mg/kg por vía I.P. los días ya mencionados, mas 4, 6 y 8 mg/kg de ácido fólico por vía intraesofágica, los otros 3 grupos sólo recibieron ácido fólico las mismas dosis y la misma vía, y el último grupo no recibió tratamiento.

Todos los animales se sacrificaron el día 19 de preñez por sobredosis de éter y se siguió con ellos el mismo procedimiento ya mencionado. En la tabla 1 se muestra en forma sintetizada el procedimiento seguido. Se determinó la diferencia de peso y tamaño de los de los fetos, promedio de fetos por camada y total de fetos por grupo, y por la observación ma-

macroscópica de las malformaciones y reabsorciones. Para el análisis de los datos de peso y tamaño se utilizó el análisis de varianza y en su caso la prueba de Tukey. (Haber 1973).

TABLA 1

LOTES	Dosis Fenitoína (mg/kg) I.P.	Dosis Acido Fólico (mg/kg) Oral
1	50	-
2	75	-
3	85	-
4	100	-
5	dosis seleccionada	4
6	"	6
7	"	8
8	-	4
9	-	6
10	-	8
11*	vehículo	-
12**	-	-

* testigo

** control negativo

DESCRIPCION DE RESULTADOS

Los resultados obtenidos, con la metodología utilizada, indican, por un lado que la fenitoína administrada a ratas preñadas de la cepa wistar por vía intraperitoneal y a las dosis utilizadas les produce teratogénesis a sus camadas, manifestandose por malformaciones que se observan macroscópicamente tales como hematomas, hipoplasia de extremidades o curvatura anormal del cuerpo, produciendose también reabsorciones fetales y una importante disminución en el peso y el tamaño de los fetos. Estos efectos se manifestaron con mayor intensidad conforme se aumento la dosis, es importante mencionar que las dosis utilizadas (50, 75, 85 y 100 mg/kg) son de 10 a 15 veces mayores que las administradas a los enfermos de epilepsia. Se decidió utilizar estas dosis porque con las dosis clinicas no se observaron efectos teratogénos, obteniendo resultados semejantes a los grupos control. Sin embargo, las dosis seleccionadas son menores que las reportadas en la bibliografía consultada, pues se mencionan dosis desde 150 hasta 800 mg/kg.

La elección de la vía intraperitoneal en lugar de la vía oral (que sería la más recomendable ya que las ratas fueron administradas por varias días) se debió a que la fenitoína se absorbe pobremente en el tracto digestivo, por lo que de haberse utilizado se tendría incertidumbre de la cantidad de fenitoína que realmente se absorbió y produjo los efectos mencionados. En las tablas 1 y 2 (graf. 1, 3 y 4) se puede observar que con las dosis de 50 y 75 mg/kg los efectos teratogénos son significativamente menores que los observados con las dosis de 85 y 100 mg/kg y entre ellas no hay diferencia significativa. Con la dosis de 100 mg/kg no sólo se presentaron los mas graves efectos teratogénos, también hubo efectos tóxicos severos en las madres, produciendoles disminución de peso y alrededor de 60% de mortalidad despues de 3 a 4 días de tratamiento. De las madres sobrevivientes sus camadas presentaron valores de peso y tamaño muy bajos, así como numerosas reabsorciones como se observa en las tablas 1 y 2. (Graficos 1 y 3).

Con la dosis de 85 mg/kg se observó disminución de peso y tamaño y un porcentaje de malformaciones en las camadas significativamente mayor que el observado con las dosis de 50 y 75 mg/kg, de aproximadamente el 50% por lo que no se considero necesario hacer el calculo exacto para encontrar la dosis efectiva 50 y se utilizó directamente para administrarle conjuntamente con el ácido fólico. A diferencia de la dosis de 100 mg/kg, esta dosis no produjo efectos tóxicos aparentes en la madre y su peso se mantuvo semejante a los otros grupos de 50 a 75 mg/kg. (Tablas 1 y 2, graf. 1,3 y 4)

El período de administración de la fenitoína se hizo entre el noveno y catorceavo día de preñez porque de acuerdo con la bibliografía consultada es en este período en que la fenitoína produce sus principales efectos teratogénicos.

Por otro lado los resultados obtenidos con los grupos de ratas preñadas a las cuales se les administró conjuntamente fenitoína, o sea, 85 mg/kg por vía intraperitoneal y dosis crecientes de ácido fólico por vía oral (4,6 y 8 mg/kg, se observa en las tablas 3 y 4 (graf. 2, 3 y 4) que conforme se aumentó la dosis del folato, se observó un aumento significativo de peso y tamaño contrariamente a lo observado en los fetos de las ratas que solamente recibieron fenitoína. Con respecto a los grupos control (con vehículo de fenitoína y sin tratamiento) y los grupos tratados con fenitoína y ácido fólico no se observaron diferencias significativas en los parámetros medidos. En la tabla 3 también se muestran los resultados obtenidos con los grupos de ratas que recibieron tratamiento con dosis crecientes de ácido fólico, observándose aumento de tamaño y peso fetal. (gráficas 2, 3 y 4).

En las tablas 2 y 4 se presentan los porcentajes de malformaciones y las reabsorciones. Se observa que conforme aumenta la dosis de fenitoína las reabsorciones son más numerosas llegando a un valor máximo de 30 % con la dosis de 85 mg/kg de fenitoína y el valor mínimo 0.0 % del grupo control vehículo. En los grupos de administración simultánea de fenitoína-ácido fólico se observó también una disminución de las reabsorciones (excepto para el grupo de 6 mg/kg con un 8.5 %) obteniéndose una protección al efecto de la fenitoína aunque nunca se llegó a los valores mínimos del grupo control vehículo. En los grupos tratados únicamente con ácido fólico se registraron valores ligeramente mayores al grupo testigo, esto probablemente se debió a que se observó hasta un 25% de aumento en el número de fetos por camada lo que aumenta la probabilidad de un mayor número de reabsorciones. (graf. 4).

En el caso de las malformaciones el valor máximo fue en el grupo de 85 mg/kg de fenitoína con un 8.6%, esto no nos está indicando que sea el valor máximo real, pues era de esperarse que la dosis de 100 mg/kg provocara mayor número de malformaciones, sin embargo con esta dosis se registró un 1.78% menor a la de 85 mg/kg debido a la alta mortalidad materna lo que disminuyó el número de fetos por camada. Aunque se presentó un caso en el grupo de 100 mg/kg de fenitoína donde se encontraron malformaciones muy serias tales como deformidad total del cuerpo, hematoma generalizado, labio leporino e hidrocefalia.

En los grupos de administración simultánea de fenitoína (85 mg/kg) y ácido fólico (4,6 y 8 mg/kg) las malformaciones disminuyeron notablemente de un 8.6% que se presenta con

fenitoína sola a un 1.21 % en el grupo de fenitoína y 8 mg/kg de ácido fólico. (Tabla 4). En los grupos testigo de ácido fólico no se registraron malformaciones lo que nos indica el nulo poder teratógeno de esta vitamina cuando es administrada en dosis mayores que en la dieta normal. (Tabla 4, grafica 3).

En la tabla 5 se puede observar el tipo y la frecuencia de las malformaciones registradas entre ellas : hemorragias cutáneas, hidrocefalia , hipoplasia de extremidades y curvatura anormal del cuerpo.

TABLA 1

EFFECTO DE LA FENITOINA SOBRE LAS CARACTERISTICAS DE LAS CAMADAS

TRATAMIENTO (mg/kg)	TAMANO (cm)	PESO (gm)	TOTAL FETOS	PROMEDIO FETAL POR CAMADA
vehículo	2.2±0.16	1.49±0.2	84	10.5
testigo	2.32±0.33	1.48±0.42	102	10.7
50 F	2.32±0.33	1.48±0.22	81	10.1
75 F	2.11±0.24	1.23±0.18	80	10.0
85 F	2.0±0.14	0.98±0.16	95	11.5
100 F	1.70±0.16	0.69±0.19	56	5.1

p<0.05

TABLA 2
 PORCENTAJE DE MALFORMACIONES Y REABSORCIONES
 INDUCIDA POR FENITOINA

TRATAMIENTO (mg/kg)	MALFORMACIONES (%)	REABSORCIONES (%)
vehículo	0.0	0.0
testigo	0.68	1.38
50 F	1.2	6.1
75 F	2.1	11.26
85 F	8.6	30.1
100 F	1.78	16.07

TABLA 3

EFFECTO DE LA SUPLEMENTACION DE ACIDO FOLICO EN LA
ADMINISTRACION CON FENITOINA

TRATAMIENTO (mg/kg)	TAMANO (cm)	PESO (gm)	TOTAL FETOS	PROMEDIO FETAL POR CAMADA
VEHICULO	2.26+-0.16	1.49+-0.20	84	10.5
TESTIGO	2.32+-0.07	1.48+-0.22	102	10.7
85F+4AF	2.32+-0.17	1.47+-0.25	72	11.3
85F+6AF	2.05+-0.25	1.19+-0.23	70	9.9
85F+8AF	1.97+-0.17	1.08+-0.18	103	12.3
4 AF	2.42+-0.08	1.54+-0.14	93	10.3
6 AF	2.32+-0.17	1.08+-0.13	101	12.3
8 AF	2.47+-0.15	1.88+-0.27	102	12.8

p < 0.05

TABLA 4

PORCENTAJE DE MALFORMACIONES Y REABSORCIONES REGISTRADAS
CON LA ADMINISTRACION SIMULTANEA DE FENITOINA Y ACIDO FOLICO

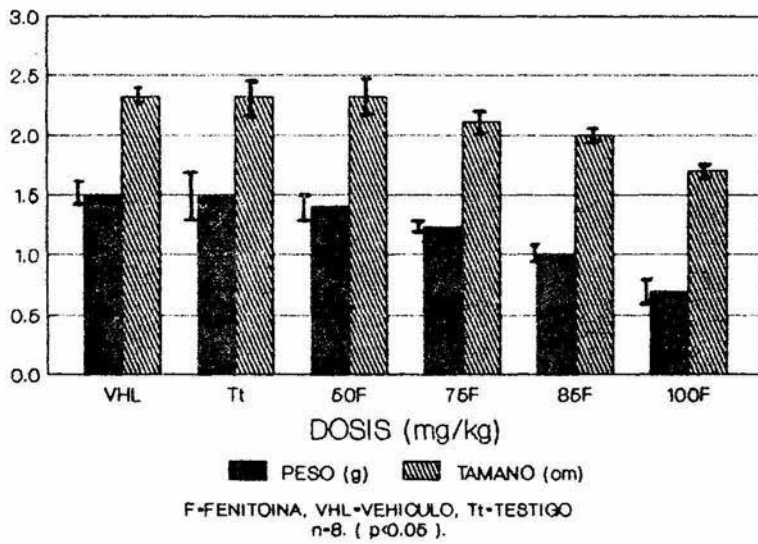
TRATAMIENTO (mg\kg)	MALFORMACIONES (%)	REABSORCIONES (%)
F+4AF	1.3	3.39
F+6AF	2.8	8.5
F+8AF	1.21	1.26
4AF	0.0	0.0
6AF	0.0	0.0
8AF	0.0	0.0
VEHICULO	0.0	0.0
TESTIGO	0.68	1.38

TABLA 5

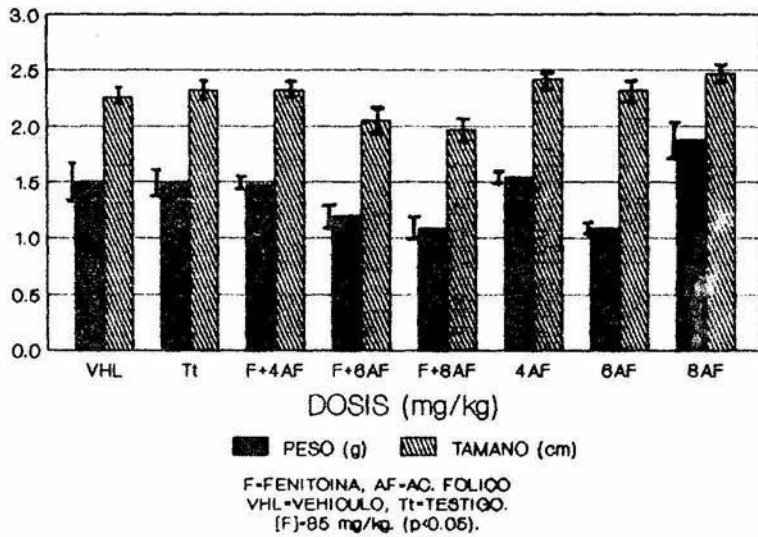
FRECUENCIA DE MALFORMACIONES REGISTRADAS

MALFORMACION	FRECUENCIA (%)
Sirenismo	3.2
Hidrocefalia	6.4
Hipoplasia de extremidades	12.9
Curvatura anormal del cuerpo	32.25
Hematomas	45.16

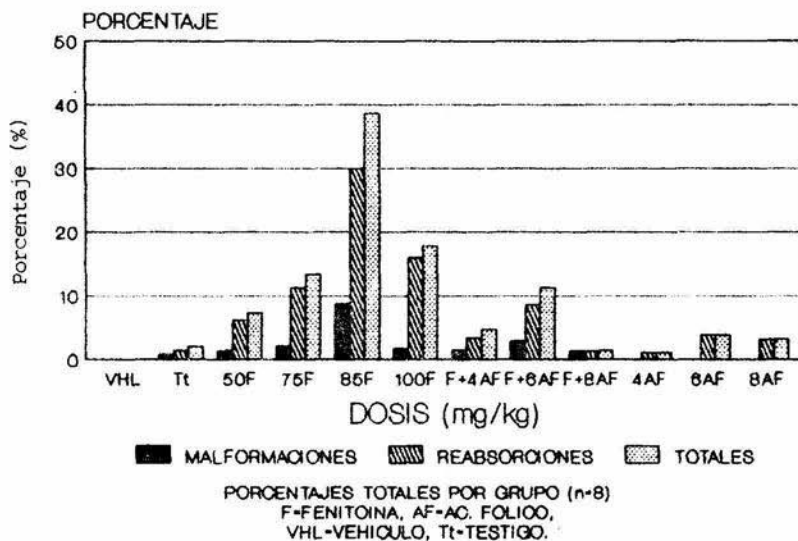
GRAFICA 1
EFFECTO DE LA FENITOINA SOBRE LAS
CARACTERISTICAS DE LAS CAMADAS



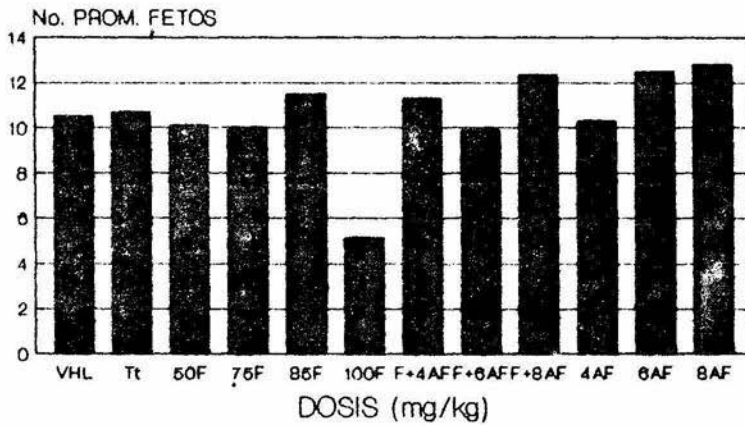
GRAFICA 2
EFFECTO DE LA SUPLEMENTACION CON
ACIDO FOLICO SOBRE LAS CAMADAS



GRAFICA 3
PORCENTAJE DE MALFORMACIONES Y
REABSORCIONES CON Y SIN ACIDO FOLICO



GRAFICA 4
DIFERENCIAS EN EL PROMEDIO
DE FETOS POR CAMADA



F-FENITONA, AF-AC. FOLICO
VHL-VEHICULO, Tt-TESTIGO.
n=8.

DISCUSION DE RESULTADOS

Los diversos trabajos de teratogenesis con fenitoina han demostrado una probable relación con el ácido fólico, sin embargo, sólo se ha utilizado un antagonista del ácido fólico (metrotexate) para observar si las malformaciones provocadas por esta deficiencia producen el mismo patrón que la fenitoina (Netzloff, 1979); sin embargo, no se han reportado trabajos en los cuales se da una suplementación con ácido fólico, por lo que se se consideró importante diseñar este estudio con suplementación de ácido fólico conjuntamente con la fenitoina en lugar de antagonizar los folatos endógenos con antimetabolitos específicos, capaces de producir otros efectos colaterales que podrían complicar la interpretación de los resultados. En la literatura consultada se mencionan dosis muy altas de fenitoina para producir teratogenesis, dosis hasta de 800 mg/kg por vía I.P. . Por lo que la idea original de este trabajo fué administrar dosis semejantes a las que se usan en clínica, aunque con estas dosis (3- 4 mg/kg aprox. 100 mg dos veces al día) la fenitoina no produjo malformaciones macroscópicas ni alteración en el tamaño y talla de las camadas de las ratas tratadas. Lo que hizo necesario administrar dosis mayores (50, 75, 85 y 100 mg/kg) hasta observar un claro efecto teratógeno de la fenitoina, que a la vez fueron dosis menores que las encontradas en la literatura, sin embargo como se observa en los resultados, las dosis empleadas como teratógenas se alejan varias veces (de 10 a 15 veces más) de las terapéuticas, acercándose a los resultados obtenidos por Harbinson y Becker (1972), quienes con dosis de 150 mg/kg encontraron una disminución en peso y tamaño de los fetos de ratas tratadas con fenitoina así como un porcentaje elevado de malformaciones semejantes a nuestros resultados.

La elección de la vía intraperitoneal en lugar de la vía oral (que sería la más recomendable ya que las ratas fueron administradas por varios días) se debió a que la fenitoina se absorbe pobremente en el tracto digestivo, por lo que de haberse utilizado se tendría incertidumbre de la cantidad de fenitoina que realmente se absorbió y produjo los efectos mencionados.

Con respecto a los resultados de tamaño fetal encontrados según la prueba estadística de análisis de varianza, si existe una diferencia de tamaño entre los grupos, indicando además por la Prueba de Tukey que existe diferencia entre los grupos a los que se les administró 85 y 100 mg/kg de fenitoina, que hace pensar que fué un efecto directo del fármaco, pues los valores de 50 y 75 mg/kg son similares a los grupos controles y grupos de fenitoina + ácido fólico. Vorhees

(1986) concluye que la fenitoína produce disminución de peso y aumento de malformaciones en rata aunque con dosis orales diez veces mayores a las nuestras.

También se encontró que la administración de ácido fólico provocó un aumento de tamaño fetal, disminuyendo el efecto de la fenitoína y provocando un aumento de peso en el caso donde sólo se administró esta vitamina. Para el grupo de fenitoína mas 6 mg/kg de ácido fólico se observa una disminución de peso, disminución de camada, y un porcentaje mayor de reabsorciones lo que podría deberse que en dos de las hembras se presentaron valores muy bajos de sobrevivencia fetal y de los otros parámetros lo que podría deberse a las diferencias genéticas individuales y las condiciones de salud de los animales pues en el grupo que recibió una dosis menor de ácido fólico (4 mg/kg) como protección si se disminuyó notablemente los efectos teratogénicos de la fenitoína.

En los grupos a los que se les administró ácido fólico únicamente presentan mayor ganancia de peso y tamaño así como un aumento considerable en el número de fetos por camada. Estos datos son semejantes con los reportados por Morgan (1978) donde suplementaron 4 mg/kg de ácido fólico (según valores del Instituto Americano de Nutrición) en la dieta normal de ratas preñadas y también encontraron un aumento hasta en doble en peso hepático, peso y tamaño corporal fetal y placentario.

Trabajos de teratogénesis de cultivo *in vitro* indican que existe una disminución de las malformaciones inducidas en embriones cuando se administra ácido fólico en presencia de cantidades plasmáticas terapéuticas de fenitoína. Y que inclusive éste defecto se mejora en presencia de cianocobalamina (vitamina B12). (Chatot et-al 1984). En este trabajo se demuestra que la suplementación *in vivo* de ácido fólico también disminuye las malformaciones producidas por la fenitoína.

Es importante observar que el mayor porcentaje de malformaciones o teratas provocadas por la fenitoína son hematomas, (45.16 %) esto coincide con diversos reportes donde se asocia como efecto secundario de este fármaco la anemia megaloblástica y trastornos relacionados con la sangre, también es evidente que se observa una disminución de estos efectos cuando se administra simultáneamente ácido fólico corroborando el efecto protector de la vitamina al efecto teratogénico del anticonvulsivante.

Aunque la teratogénesis conductual de la fenitoína en rata es discutible se sabe que la suplementación de folatos en el

cerebro disminuye la demencia y problemas de aprendizaje en niños. Si también dentro de los efectos teratogénos de la fenitoína se incluyen deficiencia del aprendizaje y actividades motoras también se puede explicar que sea debida a la deficiencia de folatos provocada por la fenitoína.

En nuestros resultados demostramos que efectivamente hay disminución de los efectos teratogénos encontrados en nuestro modelo, pues el peso y tamaño fetal disminuido por efecto de la fenitoína aumentó al suplementarse simultáneamente con ácido fólico, asimismo las malformaciones y reabsorciones también regresaron a los valores normales.

Esto es una evidencia que el mecanismo de acción teratogénico de la fenitoína es debida a la deficiencia de folatos provocada por ésta. El mecanismo por el cual es provocada esta deficiencia es sujeto de estudio para posteriores investigaciones, porque aunque nosotros demostramos que efectivamente el ácido fólico protege de malformaciones, se discute acerca del poder epileptogénico del ácido fólico, pues diversos autores mencionan una remisión de la protección anticonvulsivante de la fenitoína cuando se administra ácido fólico para controlar la anemia megaloblástica que se produce como efecto secundario en pacientes que llevan un tratamiento crónico de este anticonvulsivante. Existen otros autores que mencionan no encontrar esta remisión y que inclusive recomiendan dicha suplementación como protección para éste efecto secundario (Grant Lennart 1982, Goodman 1982).

Hansen y Billings basandose en las diversas evidencias de que el efecto teratogénico de la fenitoína es por la deficiencia de folatos que provoca, hicieron determinaciones de folatos materno y fetal en ratón y según sus resultados postularon que la fenitoína es un teratogénico "puro", pues ellas no encontraron disminuidos los niveles de folato embrionario, pero si materno, aunque esta diferencia no es estadísticamente significativa. Las autoras trabajaron con la hipótesis de que la deficiencia de ácido fólico provocada por la fenitoína es debida a la inhibición de la enzima 5,4 metyitetra- hidrofolato-reductasa (lo que Netzlöff sugiere) y encontraron que existe una deficiencia de esta enzima en presencia de la fenitoína.

Sin embargo, es importante señalar que el metabolismo de la fenitoína en rata y ratón, son diferentes e inclusive Maxwell ha demostrado que los metabolitos de la fenitoína si producen teratogenesis en ratón, lo que concuerda con la hipótesis de que para ratón es el fármaco por si mismo el que produce las malformaciones no siendo así en rata donde se hace más evidente que existe una asociación entre la

renitoina y el ácido fólico, por lo que el modelo de Hansen y Billings sería muy adecuado para evidenciar más directamente esta asociación en rata.

CONCLUSIONES

De los resultados obtenidos en este trabajo podemos concluir que:

- La fenitoína tiene efecto teratogéno en la cepa wistar de rata a dosis mayores que las utilizadas en la terapéutica y esta afecta conforme aumenta la dosis hasta llegar a ser tóxica en la madre.
- La suplementación de ácido fólico a la terapia de fenitoína disminuyó los efectos teratogénos de este fármaco, provocando aumento de peso y tamaño fetal, así como disminución de malformaciones y reabsorciones, ejerciendo por lo tanto efecto protector a la teratogenesis inducida por la fenitoína.
- Se presenta una evidencia mas para pensar que la deficiencia de ácido fólico producida por la fenitoína es un factor de las malformaciones en rata y en humano.
- Las dosis terapéuticas utilizadas en el humano no produjeron teratogenesis en la rata de la cepa wistar, siendo necesario la administración de dosis 10 veces mayores, lo cual hace pensar que la rata es mas resistente a los efectos teratogénos de la fenitoína, lo que podría atribuirse a la farmacocinética diferente de estas dos especies.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Bruckner A.Y.J. , O'shea L.K.S. and Henneberry, R.B. (1963) . Teratogenic Effects of Valproic Acid and Diphenylhydantoin on Mouse Embryos in culture. *Teratology* 27: 29-42.
- 2.- Chatot L. Klein C. L. et -al. (1984). Human Serum Teratogenicity studied by rat embryo culture : anticonvulsant drogas and nutrition. *Epilepsia* 25(2):205-216.
- 3.- Dill R.E., Jones R.G. and Davis W.L. (1986). Phenytoin induced Conective Growth in the rat. *The Anatomical Record*. 215:99-105.
- 4.- Drill's Pharmacology in Medicine. (1974). Edited by Joseph di Palma. McGraw Hill Book Co. USA . 48 Ed.
- 5.- Dwyer T.M. (1987). Phenytoin depress sodium currents in frog skeletal muscle. *Biophys. J.* 21:41a.
- 6.- Davies D.M. (1981). *Textbook of Adverse Drugs Reactions.* Oxford University Press. Oxford USA. 28 ed. pp 71-100.
- 7.- Elmazar M.M.A. and Sullivan F.M. (1981). Effect of Prenatal Phenytoin Administration on Postnatal Development of the rat: A Behavioral Teratology Study. *Teratology* 24:115-124.
- 8.- Glazko J. Anthony. (1986). Discovery of Phenytoin *Ther. Drug Mon.* 8:490-497.
- 9.- Gram Lennart. Drachman J.B. , Parnas J. and Flachs H. (1982). Controlled Trials in Epilepsy. A review. *Epilepsia* 23:491-519.
- 10.- Greenberg D. , Cooper M.D. , Carpenter C. (1984). Phenytoin Interacts with Calcium Channels in Brain Membranes. *Ann. Neurol.* 16: 617- 619.
- 11.- Goodman L.S. Guilman H.J. and Roses. (1982). *Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica.* Ed. Panamericana. México. 6a. Edición.
- 12.- Fredick J. : (1973) . Epilepsy and Pregnancy: A report from the Oxford Record Linkage Study. *Brith. Med. J.* 2:442-448.
- 13.- Hakim M. A., Arrieta M.J., Cooper B.A. and Pappius H.M. (1984). Effect of Folate Deficiency on Local Cerebral Glucose Utilization in the Rat. *J. Neurochem.* 42(6): 1582-1587.

- 14.- Hansen D. K. and Billings R.E. (1985). Phenytoin Teratogenicity and Effects on Embryonic and Maternal Folate metabolism. *Teratology* 31:363-371.
- 15.- Hanson W. J. and Smith W. D. (1975). The Fetal Hydantoin Syndrome. *J. Pediatrics* 87(2):285-290.
- 16.- Hanson W. J., Myrianthopoulos N.C., Sedwick A.M.H. and Smith D.W.. (1976). Risks to Offspring of Women treated with Hydantoin Anticonvulsant, with Emphasis on the Fetal Hydantoin Syndrome. *J. Pediatrics* 84(4): 662-668.
- 17.- Harbinson D. R. and Becker B.A. (1972). Diphenylhydantoin Teratogenicity in Rats. *Tox. Appl. Pharm.* 22:193-200.
- 18.- Loomis T.A. (1974). *Essentials of Toxicology*. Edit. Lea & Febiger. Phila. 2a. ed.
- 19.- Noda H., Eto S., Minemoto M., Noda A., Ohno K. (1987). Effects of Isoniazid and Its Metabolites on Phenytoin Biotransformation in Isolated Rat Hepatocytes. *Chem. Pharm. Bull.* 35(1):277-281.
- 20.- Katzung G. B. (1981). *Farmacología Básica y Clínica*. Ed. Manual Moderno. México.
- 21.- Kapetanovic I.M. and Kupferberg H.J. (1985). Inhibition of Microsomal Phenytoin Metabolism by Nafimidone and Related Imidazoles. Potency and Structural Considerations *Drug Met. and Disp.* 10(4):430-437.
- 22.- Keith A. D., Paz A.M., and Gallop G.M. (1977). The Effect of Diphenylhydantoin on Fibroblasts in Vitro. *J. Dent. Res.* 56(10):1279-1283.
- 23.- Kimmel A. C. and Trimmell C. (1981). A Rapid Procedure for Routine Double Staining of Cartilage and Bone in Fetal and Adult Animals. *Stain Tech.* 56(5):271-273.
- 24.- Krauss, M.D., Holmes L.W., Vanlang O.N. and Keith F.A. (1984). Four Siblings with Similar Malformations After Exposure To Phenytoin and Primidone. *J. Pediatrics* 105(5):750-755.
- 25.- Lakos P. and Czeisel. (1977). A Teratological Evaluation of Anticonvulsants Drugs. *A. Paed. Acad. Scie. Hung.* 18(2):145-153.

- 26.- Lorente A. C., Tassinari M.B. and Keith D.A.. (1981).
The Effects of Phenytoin on Rat Development: An
Animal Model System for Fetal Hydantoin Syndrome.
Teratology 24:169-180.
- 27.- Martz F.C. , Failinger I. and Blake D.A. (1977).
Phenytoin Teratogenesis: Correlation between
Embriophatic Effect of Phenytoin and Covalent Binding
Putative Arene Oxide Metabolite in Gestational Tissue
J. Pharmacol. Exp. Ther. 203:231-239.
- 28.- Maxwell J.D. , Hunter D.A., Stewart S., Anderman and F.
Williams. (1972). Folate Deficiency after Convulsant
Drugs: An Effect on Hepatic Enzyme Induction?
Bith. Med. J. 1:297-299.
- 29.- Morello S. R. , Begenesich T. and Yeh J.Z.. (1984).
Determination on the Active Form of Phenytoin.
J. Pharm Exp. Ther. 230(1):156-161.
- 30.- Morgan B.L.G. and Winick M. (1978). The Effects of Folic
Acid Supplementation During Pregnancy in the rat.
British J. Nut. 40:529-533.
- 31.- Netzloff M.L., Streiff M.R., Frias J.L. and Rennert O.M.
(1979). Folate Antagonism Following Teratogenic
Exposure to Diphenylhydantoin.
Teratology 19:45-50.
- 32.- Perry J.G. , McKinney L. and De Weer F. . (1978).
The Cellular Mode of Action of the Anti-epileptic
Drug 5,5- diphenylhydantoin.
Nature 272:271-273.
- 33.- Philbert A. and Dam M.. (1982). The Epileptic Mother
and Her Child.
Epilepsia 23:85-99.
- 34.- Saxén L. (1976). Mechanisms of Teratogenesis.
J. Embriol. Exp. morph. 36(1):1-12.
- 35.- Schwartz P. , Rhodes C.T. and Cooper J.W. (1977).
Solubility and Ionization Characteristics of
Phenytoin.
J. Pharm Sci. 66(7):994-997.
- 36.- Spielman H.G. , Eibbs U. H. and Müller J. (1982).
Studies on the Action of Drugs During the
Preimplantation Period in Laboratory Animals.
Expl. Biol. Med. 7:162-169.
- 37.- Selzer E. M. , David G. and Yaari Y. (1985).
On the mechanism by Wich Phenytoin blocks post-
tetanic potentiation the Frog Neuromuscular.
J. Neurosci. 5(11):2894-2899.

- 38.- Sokal and Rohlf. (1969). Biometria. The Principles and Practique of Statics in Biological Research St. Francisco USA Ed. W. Freeman Co.
- 39.- Vorhees V. C. (1986)a . Principles of Behavioral Teratology from Handbook of Behavioral Teratology. Edited by Edward P. Riley and Charles V. Vorhees. Plenum Publishing Co. EUA. pp 23-47.
- 40.- Vorhees V. C. (1986). Developmental Effects of Anticonvulsants. Neurotoxicology 7(2):235-244.
- 41.- Vorhees V. C. (1987). Fetal Hydantoin Syndrome in Rats: Dose-Effect Relationships of prenatal Phenytoin on postnatal Development and Behavior . Teratology 35:287-303.
- 42.- Tagbo R.M. and Hill L.A. (1977). Effect of Folic Acid Deficiency on Pregnant Rats and Their Offsprings Can J. Physiol. Pharmacol. 55:527.
- 43.- Trimble M. , Corbett A. and Donaldson D. (1980). Folic Acid and Mental Symptoms in children witch epilepsy. J. Neurol. Neurosurg. Psych. 43:1030-1034.
- 44.- Warcnock S. T. (1979). Correlation Between Maternal and Fetal Folic Acid Status Day 21 of Gestation in rats. Nutr. Rep. Int. 19(2):267-273.
- 45.- White H.S., Yen-Chow Y.C., Kemp J.W. and Woodbury M. (1985). Effects of Phenytoin on Primary Glial Cell Cultures. Epilepsia 26(1): 58-68.